Contribution à l'étude du pouvoir inhibiteur des extraits aqueux et alcooliques de tourbe vis-à-vis d'un germe du sol (*)

par J. RAMAUT
Assistant

Les tourbières sont des biotopes très particuliers dont l'étude révèle une grande complexité biologique et physico-chimique.

Il en existe de deux types : les tourbières acides et les tourbières basiques.

Nous considérons uniquement dans ce travail les problèmes posés par les tourbières acides.

Actuellement, beaucoup de questions que l'on se pose au sujet de celles-ci sont loin d'être résolues et leur microbiologie, en particulier, constitue un sujet d'études très intéressant.

Pendant près d'un siècle, les tourbières ont été considérées comme des milieux stériles où la vie microbienne était un accident et où les microorganismes ne jouaient aucun rôle. Les géologues et les chimistes pensaient que la tourbification résultait de processus chimiques non biologiques d'hydrolyse, d'oxydation, de réduction et de condensation (1).

A cette conception s'est opposée celle de nombreux chercheurs (2) qui, dès 1912, ont démontré la présence de microorganismes dans les tourbes. Ces chercheurs ont établi le rôle actif des bactéries et des moisissures dans la dégradation des matières organiques des sols tourbeux. Selon eux, la tourbification est un phénomène biologique ; son aspect chimique est secondaire.

L'Ecole de Waksman (3) distingue trois groupes de micro-

(*) Présenté par R. BOUILLENNE et M. BOUILLENNE-WALRAND.

organismes qui ont des rôles distincts dans la formation et la décomposition des tourbes :

1) Les microorganismes qui opèrent une destruction rapide et partielle des résidus végétaux et donnent ainsi naissance à la tourbe jeune; ces organismes sont essentiellement aérobies.

2) Les microorganismes qui, après formation de la tourbe, la transforment, la dégradent lentement et continuellement; ils sont surtout anaérobies .

3) Les microorganismes qui, dans une tourbière drainée, décomposent la tourbe avec production de substances favorables à la végétation.

Les tourbières acides ont, en général, une micro-flore abondante cependant démunie de certains genres et espèces; de plus, l'activité desmolytique des germes qu'on y trouve doit être très faible.

Pour expliquer les caractères de la microflore, divers auteurs ont attiré l'attention sur le pH très acide des sols tourbeux (pH 3.8 — 4.5); le pH entraînerait la présence d'une microflore acidophile. Il limiterait la prolifération de nombreux germes ([4]).

D'autres auteurs insistent sur les conditions d'anérobiose créées par la saturation du milieu en eau. Le manque d'aération semble avoir une influence précise sur le maintien du milieu tourbeux puisque une tourbe drainée et aérée manifeste tout de suite des signes de décomposition.

Il nous paraît qu'un faisceau de facteurs physico-chimiques joue un rôle dans la composition de la flore microbienne des tourbières, et qu'il convient d'être prudent lorsqu'on discute de leur importance relative.

En 1948, il a été démontré ([5]) que :

1) La solution acétonique de l'extrait éthéré de tourbe possède une action bactéricide; ces substances bactéricides de la tourbe n'ont pas été identifiées.

2) L'acidité naturelle de la tourbe n'est pas le facteur exclusif qui en limite la population bactérienne; elle n'explique pas l'absence de certains germes, tel *Sarcina lutea*, qui peuvent vivre en bouillon au pH 4.2.

3) Il existe dans la tourbe des germes à activité bactériostatique et bactériolytique.

Nous rencontrons dans ces trois conclusions des faits qui n'avaient pas encore été aperçus et qui peuvent être mis en relation avec les particularités de la flore microbienne des tourbes. De plus, Sphagnum, mousse turfigène, semble, par nos travaux actuels, jouer un rôle important dans les faits observés. Nous savons que son métabolisme aboutit à la formation et à la mise en liberté de substances acides que nous avons isolées.

En 1939 déjà, L. Delarge ([6]) avait attiré l'attention sur le rôle du complexe biologique « Sphagnetum » dans l'acidité de nos tourbières.

En 1952, Pochon et de Barjac ([7]) mettent en évidence des faits du même type. Ces auteurs préparent suivant la méthode classique, des extraits aqueux de tourbe. Ils mélangent des poids égaux de tourbe et d'eau et les abandonnent à la macération durant 24 heures; ils filtrent ensuite et recueillent *un extrait aqueux à froid*; cet extrait est stérilisé par passage sur bougie.

Un extrait aqueux à chaud s'obtient en soumettant la tourbe, après 24 heures de macération, à l'action de l'autoclave durant 30 minutes, à 120 — 130° C. La filtration et la stérilisation se font comme pour l'extrait aqueux à froid. Les extraits de tourbe, ainsi obtenus, présentent un pH 6.2 — 6.3 — 6.7. (*)

L'extrait témoin est préparé en remplaçant la tourbe par de la terre. Son pH est de 7.

Les différents extraits de tourbe et de terre témoin sont ensemencés avec les organismes contenus dans une dilution 10^{-3} ou 10^{-7} d'une terre du Jardin de l'Institut Pasteur. Ils sont mis à incuber à 28° C.

(*) Nous voudrions préciser que dans nos extraits aqueux réalisés suivant la méthode classique, nous n'avons jamais atteint de pH aussi peu acide. Nos échantillons prélevés dans les tourbières de la Baraque-Michel ont un pH compris entre 4.0 et 4.6 au moment du prélèvement. Les extraits aqueux à froid ont pH 5.5 à 5.9, les extraits aqueux à chaud pH 5 à 5,5, d'où nous devons les neutraliser avant utilisation.

Les résultats de Pochon et de Barjac mettent en évidence une *action inhibitrice* des extraits aqueux vis-à-vis des germes d'un sol minéral, action qu'on ne peut imputer à l'acidité puisque tous les extraits ont un pH proche de la neutralité. En collaboration avec J. Ory, nous avons confirmé cette action inhibitrice en suivant la technique proposée par ces auteurs.

Il nous paraît cependant nécessaire d'insister sur le fait que les extraits aqueux de tourbe sont des milieux oligo-trophiques beaucoup moins riches que l'extrait témoin d'un sol minéral. Il est donc possible que la croissance des germes du sol soit fortement ralentie sur extrait de tourbe non pas à cause de son action inhibitrice, mais à cause de la pauvreté du milieu.

Il nous a paru intéressant au cours de ce travail de vérifier l'action inhibitrice des extraits aqueux de tourbe. Nous n'avons pas suivi la technique de Pochon et de Barjac parce que nous avons cru indispensable d'expérimenter de manière à éliminer l'influence possible d'une différence dans les constituants des milieux tourbeux et témoins. D'autre part, nous avons recherché, en outre, si les extraits alcooliques de tourbe ne révèlent pas eux aussi une action inhibitrice.

MATERIEL ET METHODES

1. — Les extraits aqueux ont été préparés d'une manière toute différente de celle proposée par la méthode classique des extraits de sols.

a) *Extrait aqueux à froid*

100 gr. de tourbe fraîche sont placés dans 300 cc. d'eau distillée et abandonnés en macération durant 24 heures; ensuite, on agite d'une manière continue pendant 3 heures (Vibro-Misher), on filtre et réduit le volume de la solution à 20 cc. par distillation souspression réduite.

On stérilise par filtration sur bougie et on utilise la solution.

b) *Extrait aqueux à chaud*

100 gr. de tourbe fraîche sont placés dans 500 cc. d'eau distillée et soumis à ébullition à reflux pendant 3 heures. On filtre et la solution est évaporée à sec par simple ébullition. On recueille un extrait sec, brun noirâtre; une quantité pesée de cet extrait est remise en solution dans l'eau distillée, stérilisée à l'autoclave 10 minutes à 120° C.

2. — L'extrait alcoolique provient d'une lixiviation de tourbe sèchée et broyée par l'alcool méthylique; la solution alcoolique est distillée sous pression réduite et amenée à siccité. On redissout l'extrait sec dans l'alcool éthylique et on utilise la solution obtenue.

3. — Le milieu témoin est le bouillon liquide, pH 7.

4. — L'ensemencement des milieux se fait avec 1 cc. d'une suspension de *Sarcina lutea*, bactérie commune des sols minéraux; l'incubation est réalisée à 26-28° C.

COMPORTEMENT DE SARCINA LUTEA EN BOUILLON + EXTRAIT AQUEUX OBTENU A FROID

9 cc. bouillon + 5 cc. extrait aqueux + 1 cc. suspension Sarcina.

9 cc. bouillon + 5 cc. eau stérile + 1 cc. suspension Sarcina.

Incubation à 28° C.

RESULTATS

Temps en jours	Nombre de colonies par c.c., dans :	
	Bouillon + Extrait	Bouillon-Témoin
0	18×10^5	18×10^5
3	1×10^5	450×10^5

1. — Dans le témoin, on observe une prolifération intense de *Sarcina lutea*.

2. — En présence de l'extrait, on assiste à une mortalité nette de la bactérie.

3. — L'acidité du milieu ne peut expliquer ces différences car le pH est voisin de 7. dans tous les milieux.

Comportement de Sarcina lutea en bouillon + extrait aqueux obtenu a chaud

Nous disposons d'une solution à 1 % d'extrait sec.

Nous en utilisons respectivement 0,5 cc soit 5 mgr. d'extrait sec et 2 cc. soit 20 mgr. d'extrait sec.

8 cc. de bouillon + 0,5 cc de solution + 1 cc. de suspension + 1,5 cc. eau stérile.

8 cc. bouillon + 2,0 cc. de solution + 1 cc. de suspension

8 cc. de bouillon + 1 cc. de suspension + 2 cc. eau stérile.

Temps en jours	Nombre de colonies par c.c., dans :		
	Bouillon + 5 mgr. extrait	Bouillon +20 mgr. extrait	Témoin (Bouillon)
0	4×10^6	4×10^6	4×10^6
2	2×10^6	4×10^5	62×10^6

1. — Dans le témoin, on observe une nette prolifération de *Sarcina lutea*.

2. — En présence de 5 mgr. d'extrait, il y a deux fois moins de germes viables.

3. — En présence de 20 mgr. d'extrait, il y a dix fois moins de germes viables.

4. — L'influence du facteur « Acidité » est écartée, dans tous les milieux, le pH est voisin de 7.

En conclusion, l'addition au bouillon d'extrait aqueux de tourbe, qu'il soit obtenu à froid ou à chaud, entraîne une des-

truction partielle des germes présents. D'après les résultats, on se trouverait en présence d'une action bactéricide.

Les extraits aqueux obtenus à chaud n'ayant pas été réalisés par emploi de l'autoclave à 120° C. durant 30 minutes, la tourbe n'a pu, comme le prétend Waksman ([3]), libérer des substances toxiques pour les bactéries, S. lutea en particulier; de ce fait, l'action inhibitrice résulte de substances naturellement présentes dans la tourbe.

Action d'un extrait alcoolique de tourbe sur une suspension de Sarcina lutea

L'extrait sec issu de la solution méthylique est repris par 5 à 8 cc. d'alcool éthylique 96°.

Nous disposons d'autre part d'une suspension de Sarcines contenant 52×10^5 colonies par cc. et nous opérons à un pH voisin de la neutralité.

ESSAI I

9 cc. de bouillon + 1 cc. de suspension + 0,5 cc. d'alcool 96° (Témoin).

9 cc. de bouillon + 1 cc. de suspension + 0, 5 cc. d'extrait alcoolique.

Temps	Nombre de colonies par c.c., dans :	
	Bouillon + 0,5 alcool	Bouillon + 0,5 d'extrait
0 jour	52×10^5	52×10^5
5 jours	11×10^5	5×10^5

ESSAI II

9 cc. de bouillon + 1 cc. de suspension + 0,2 cc. d'alcool (Témoin).

9 cc. de bouillon + 1 cc. de suspension + 0,2 cc. d'extrait alcoolique.

Temps	Nombre de colonies par c.c., dans :	
	Bouillon + 0,2 Alcool	Bouillon + 0,2 extrait
0 jour	25×10^6	25×10^6
8 jours	44×10^6	11×10^6

Au terme de ces deux essais, on note :

1. — L'alcool manifeste son pouvoir antiseptique là où il intervient à raison de 0,5 cc. pour 9 cc. de bouillon. La différence entre tubes recevant 0,5 cc. d'alcool ou 0,5 cc. d'extrait alcoolique de tourbe reste cependant significative.

2. — En dehors de cette action antiseptique propre à l'alcool, on constate que l'extrait alcoolique de tourbe inhibe nettement le développement de *Sarcina*; il a donc une action bactéricide.

De l'ensemble de ces expériences on peut conclure que :

1) Les extraits aqueux de tourbe ont une action inhibitrice sur la multiplication de *Sarcina lutea*.

2) L'extrait alcoolique est également inhibiteur de la prolifération de cet organisme.

Institut Botanique de l'Université de Liège
et Station scientifique des Hautes Fagnes.

BIBLIOGRAPHIE

1. — BERSCH, W., *Handbuch der Moorkultuur*, Ed. 2. W. Frick, Wien U. Leipzig 1912, cité dans Waksman, Peat of New Jersey; 1942.
2. — WAKSMAN, W. A. and STEVENS, K. R., *Contribution to the chemical composition of peat : V. The role of microorganisms in peat formation and decomposition*. Soil Sci. 28 : 315-340, 1929/34, 95-113, 1932.
3. — WAKSMAN S. A., *The peats of New Jersey and their utilization*. Part A. 1942.

4. — Miss A. VAN OVEN, citée dans *Ecology of a Sphagnum Bog*. Baas-Becking et Nicolai : Blumea Vol. I, 1; 1934.

5. — J. RAMAUT. *Quelques observations microbiologiques des tourbières acides du Trou Brouly*; Soc. Roy. des Sci. de Liège, N° 2; 1948.

6. — L. DELARGE. *Variation du p^H des eaux des tourbières de la Baraque. Michel sous l'influence de la pluie et de la sécheresse*. A. F. A. S. 63e Session, 1939 et Ref'ets d'une âme, Léon Delarge, 1914-1940, p. 59-64-Liège, Vaillant-Carmanne.

7. — POCHON et DE BARJAC, H. *Action inhibitrice des extraits aqueux de tourbe sur la croissance des germes du sol*. Ann. Inst. Pasteur 1952, 82 (2) 196-199.